

Translation

10/511232

PCT/EP2003/003638

PATENT COOPERATION TREATY



12 OCT 2004 PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P 63006	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP2003/003638	International filing date (day/month/year) 08 April 2003 (08.04.2003)	Priority date (day/month/year) 15 April 2002 (15.04.2002)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/861		
Applicant UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 3 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 14 November 2003 (14.11.2003)	Date of completion of this report 13 July 2004 (13.07.2004)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP2003/003638

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages _____ 1-29 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____ 1-18 _____, filed with the letter of _____ 07 May 2004 (07.05.2004)
- ☒ the drawings:
pages _____ 1/8-8/8 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 03/03638

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-18	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	4	YES
	Claims	1-3, 5-18	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-18	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

This report makes reference to the following documents:

- D1: NAKAGAWA SHINSAKU ET AL: 'Tetracycline-regulatable adenovirus vectors: Pharmacologic properties and clinical potential' EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, Vol. 13, No. 1, pages 53-60, April 2001
- D2: STRATHDEE C A ET AL: 'Efficient control of tetracycline-responsive gene expression from an autoregulated bi-directional expression vector' GENE, Vol. 229, No. 1-2, pages 21-29, 18 March 1999

1. The subject matter of claims 1-3 and 5-18 does not involve an inventive step (PCT Article 33(3)) for the following reasons:

i) Document D1 is regarded as the closest prior art and discloses a recombinant adenovirus vector for the *in vivo* immunotherapy of prostate cancer and which contains a transgene coding for IL-12 controlled by a tetracycline-regulated expression system. D1 proposes two systems for the tetracycline-regulated expression control: a two-component system in which the transgene is located on an adenovirus under the control of TRE (TetO) and a minimal

promoter (e.g. of CMV), and tTA is located on a second adenovirus and is controlled by a constitutive promoter; and a single-component system, in which the transgene and the tTA-gene are located on the same adenovirus vector (D1: page 55, chapter 4 and figure 1). The subject matter of claims 1-3 and 5-18 of the present application differs from the disclosure of D1 in that a bi-directional tetracycline-regulated expression system was used.

ii) The present invention can therefore be considered to address the problem of providing an alternative tetracycline-regulated expression system in adenovirus vectors which can be used to efficiently and securely express transgenes, such as the IL-12 gene, especially *in vivo*.

iii) The solution proposed in claims 1-3 and 5-18 of the present application cannot be considered inventive because the bi-directional tetracycline-regulated expression system used in the application (with and without introns) was already described with all its advantages - including for use *in vivo* - in D2 (D2: figures 1 and 2 and the abstract). A person skilled in the art would therefore also be able to use the bi-directional tetracycline-regulated expression system known from D2 with an adenovirus vector according to D1, to like effect, and would thus arrive at claims 1-3 and 5-18 without being inventive, especially since D1 already mentions that both the single-component and the two-component systems have drawbacks.

iv) It is pointed out that a time-consuming adaptation of the bi-directional expression system of D2 to the special nature of the selected viral vectors lies within the scope of normal practice in the field of biotechnology and

cannot therefore substantiate an inventive step.

v) An inventive step might possibly be recognised in a subject matter related to the adenoviral vectors described in the examples given in the present application, but only if the applicant can demonstrate that these adenoviral vectors show surprising technical advantages which go beyond those which could be expected from the simple combination of the vector according to D1 with the expression system according to D2.

2. Contrary to PCT Article 6, claim 4 is not supported by the description because no example is described of the use of the Iac repressor. The present application therefore does not contain any indication of a technical nature that could support claim 4.

PCT

REC'D 14 JUL 2004

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT
 (Artikel 36 und Regel 70 PCT)

PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts P 63006	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/PEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/03638	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 08.04.2003	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 15.04.2002
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/861		
Anmelder UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF, et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

- ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Bescheids
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Regel 66.2 a)ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags

14.11.2003

Datum der Fertigstellung dieses Berichts

13.07.2004

Name und Postanschrift der mit der Internationalen Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt
 D-80298 München
 Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
 Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Mandl, B

Tel. +49 89 2399-8434



I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):

Beschreibung, Seiten

1-29 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Ansprüche, Nr.

1-18 eingegangen am 11.05.2004 mit Schreiben vom 07.05.2004

Zeichnungen, Blätter

1/8-8/8 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-20, , eingereicht mit dem Antrag.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um:

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
 - ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
 - ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).
3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:
- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
 - ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
 - ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
 - ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/03638

☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-18
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (IS)	Ja: Ansprüche 4
	Nein: Ansprüche 1-3,5-18
Gewerbliche Anwendbarkeit (IA)	Ja: Ansprüche: 1-18
	Nein: Ansprüche:

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: NAKAGAWA SHINSAKU ET AL: 'Tetracycline-regulatable adenovirus vectors: Pharmacologic properties and clinical potential' EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, Bd. 13, Nr. 1, Seiten 53-60, April 2001

D2: STRATHDEE C A ET AL: 'Efficient control of tetracycline-responsive gene expression from an autoregulated bi-directional expression vector' GENE, Bd. 229, Nr. 1-2, Seiten 21-29, 18. März 1999

1) Der Gegenstand der Ansprüche 1-3 und 5-18 beruht aus folgenden Gründen nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit im Sinne von **Artikel 33(3) PCT**:

i) Dokument **D1**, wird als nächstliegender Stand der Technik angesehen. Es offenbart einen rekombinanten Adenovirus-Vektor für die *in vivo* Immuntherapie von Prostatakrebs, der ein für IL-12 kodierendes Transgen enthält, das von einem Tetracyclin-regulierten Expressionssystem kontrolliert wird. Für die Tetracyclin-regulierte Expressionssteuerung schlägt D1 zwei Systeme vor: ein Zweikomponentensystem bei dem das Transgen auf einem Adenovirus unter der Kontrolle von TRE (TetO) und einem Minimalpromoter (z.B. von CMV) steht und tTA auf einem zweiten Adenovirus vorliegt und von einem konstitutiven Promoter kontrolliert wird; und ein Einkomponenten System, bei dem Transgen und tTA-Gen auf dem selben Adenovirus- Vektor vorliegen (D1: Seite 55, Kapitel 4 und Abbildung 1). Der Gegenstand der Ansprüche 1-3 und 5-18 der vorliegenden Anmeldung unterscheidet sich von den Offenbarungen von D1 dadurch, daß ein bidirektionales Tetracyclin-reguliertes Expressionssystem verwendet wurde.

ii) Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, daß ein alternatives Tetracyclin-reguliertes Expressionssystem in Adenovirus-

Vektoren zur effizienten Expression von Transgenen, wie des IL-12-Gens, verwendet werden soll, die vor allem *in vivo* sicher angewendet werden können.

iii) Die in Ansprüchen 1-3 und 5-18 der vorliegenden Anmeldung vorgeschlagene Lösung kann nicht als erfinderisch betrachtet werden, weil das in der Anmeldung eingesetzte bidirektionale Tetracyclin-regulierte Expressionssystem (mit und ohne Introns) in D2 schon mit allen seinen Vorteilen - auch für die *in vivo* Anwendung - beschrieben wurde (D2: Abbildungen 1 und 2 und Zusammenfassung). Für den Fachmann wäre es daher möglich, das aus D2 bekannte bidirektionale Tetracyclin-regulierte Expressionssystem ohne weiteres auch bei einem Adenovirus-Vektor gemäß D1 mit entsprechender Wirkung anzuwenden und auf diese Weise ohne erfinderisches Zutun zu den Ansprüchen 1-3 und 5-18 zu gelangen. Insbesondere, weil D1 schon erwähnt, daß sowohl das Einkomponentensystem als auch das Zweikomponentensystem Nachteile haben.

iv) Es wird darauf hingewiesen, daß ein zeitaufwändiges Anpassen des bidirektionalen Expressionssystems aus D2 an die spezielle Beschaffenheit des ausgewählten viralen Vektors im Rahmen der üblichen Arbeit in der Biotechnologie liegt und deshalb nicht als Argument für erfinderische Tätigkeit gelten kann.

v) Eine erfinderische Tätigkeit könnte eventuell für einen Gegenstand anerkannt werden, der sich auf die in der vorliegenden Anmeldung in den Beispielen beschriebenen adenoviralen Vektoren bezieht, jedoch nur unter der Voraussetzung, daß der Anmelder für diese adenoviralen Vektoren überraschende technische Vorteile belegt, Vorteile also, die über das, was durch die einfache Kombination des Vektors aus D1 mit dem Expressionssystem aus D2 zu erwarten wäre, hinausgehen.

2) Der Anspruch 4 wird nicht, wie in **Artikel 6 PCT** vorgeschrieben, durch die Beschreibung gestützt, da kein einziges Beispiel gegeben wird, das die Verwendung des lac-Repressors beschreibt. Die vorliegende Anmeldung enthält somit keine Angaben technischer Natur, die den Anspruch 4 unterstützen würden.

PCT/EP03/03638

P 63006 - Mai 2004

Patentansprüche

1. Rekombinanter viraler Vektor, der ein Insert enthält, das die allgemeine Struktur

tTA - Intron¹ - TK⁺ - TetO₂ - CMV⁺ - Intron² - Transgen

aufweist, wobei

TetO₂ der heptamerisierte Tetracyclin-Operator ist,

TK⁺ der minimale Thymidin Kinase-Promotor ist,

tTA eine Nukleinsäuresequenz ist, die für ein Fusionsprotein aus dem durch Tetracyclin induzierbaren Repressorprotein und der transkriptionellen Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus VP16 kodiert,

CMV⁺ der minimale Cytomegalievirus-Promotor ist und

Transgen eine für ein nicht-virales Protein kodierende Nukleinsäuresequenz ist,

Intron¹ eine beliebige nicht-kodierende Nukleinsäuresequenz mit einer Länge von 0 bis etwa 1000 bp ist und

Intron² eine beliebige nicht-kodierende Nukleinsäuresequenz mit einer Länge von 0 bis etwa 1000 bp ist.

2. Vektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Insert in umgekehrter Orientierung in das virale Vektorgenom inseriert ist.

3. Vektor nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Positionen von tTA und Transgen im Insert vertauscht sind.
4. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Insert zwischen 'CMV⁺' und 'Intron²' oder zwischen 'Intron²' und 'Transgen' zusätzlich einen lac-Repressor (lacR) enthält.
5. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Transgen eine für ein Fluoreszenzprotein, für Luciferase, Interleukin-12 (IL-12), Interleukin-18 (IL-18), Interleukin-2 (IL-2), Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) oder Interferon- γ (IFN- γ) kodierende Nukleinsäuresequenz ist.
6. Vektor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß IL-12 ein single-chain Interleukin-12 ist.
7. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Virus ein Adenovirus, ein Adenoassoziiertes Adenovirus (AAV), ein Retrovirus, insbesondere ein Humanes Immundefizienzvirus (HIV), ein Herpes Simplex Virus, ein Hepatitis-B Virus oder ein Hepatitis C-Virus ist.
8. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Insert in die E1- und/oder die E3-Region eines rekombinanten Adenovirus einkloniert ist.
9. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß er durch homologe Rekombination eines viralen Plasmids und eines Expressionsplasmids mit der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz erhältlich ist.

10. Expressionsplasmid mit der in SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5 dargestellten Nukleinsäuresequenz.
11. Verwendung eines Plasmids nach Anspruch 10 zur Herstellung eines Vektors nach den Ansprüchen 1 bis 9.
12. Verwendung der Vektoren nach den Ansprüchen 1 bis 9 zur *in vitro*-Genexpression in eukaryoten Zelllinien.
13. Verwendung der Vektoren nach den Ansprüchen 1 bis 9, bei denen 'Transgen' für ein therapeutisch wirksames Protein kodiert, zur Herstellung eines Medikamentes zur Gentherapie.
14. Verwendung nach Anspruch 13, bei dem das Transgen IL-2, IL-12, IL-18, TNF- α oder IFN- γ und die Gentherapie die Gentherapie maligner Erkrankungen ist.
15. Verwendung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die maligne Erkrankung ein solider Tumor ist.
16. Verwendung nach den Ansprüchen 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass man die Genexpression mit Doxycyclin, Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin, Demeclocyclin, Methacyclin oder Minocyclin, reguliert.
17. Verwendung der Vektoren nach den Ansprüchen 1 bis 9, bei denen 'Transgen' für ein Reporterprotein kodiert, zum Nachweis von Tetracyclin oder einem Derivat desselben in biologischen, lebensmittelchemischen oder ähnlichen Proben.
18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Derivat Doxycyclin ist.